

Флуоресцентный субстрат фосфолипазы A2

Болдырев И.А., Молотковский Ю.Г., Водовозова Е.Л.

Институт Биоорганической Химии им. Акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, ул. Миклухо-Маклая 16/10, Москва, Россия. Факс: 495 330 6601; тел: 495 330 6610; E-mail: ivan@lipids.ibch.ru

Сердечно-сосудистые заболевания сопровождаются возрастанием активности секреторной фосфолипазы A2. Для определения активности фосфолипазы используются флуоресцентные липидные зонды, содержащие одновременно и флуорофор, и специфический тушитель его флуоресценции. Расщепление зонда фосфолипазой отслеживается по возрастанию флуоресценции. Проблема состоит в повышении чувствительности зондов. Нам удалось сконструировать зонды у которых и флуорофор и тушитель располагаются параллельно поверхности фосфолипидной мембраны. При этом переходные диполи флуорофора и тушителя ориентируются параллельно друг другу, что значительно повышает вероятность переноса энергии (эффективность тушения флуоресценции зонда). Как следствие снижается фоновый уровень флуоресценции и повышается чувствительность зонда.

Введение

Определение активности секреторной фосфолипазы A2 в крови является весьма актуальным, поскольку в последние годы установлено резкое возрастание активности данного фермента при сердечно-сосудистых заболеваниях. Многочисленные исследования показали, что контроль активности секФЛА2 позволяет более точно диагностировать различные осложнения атеросклероза, такие как инфаркт, инсульт и т.д. Повышение активности этого фермента в крови пациентов в течение 2-х дней после острого инфаркта миокарда является свидетельством развития повторного инфаркта миокарда. Стабильное повышение активности секФЛА2 в крови пациентов после коронарной ангиопластики (операция по расширению просвета артерии) является показателем рестеноза (повторного сужения просвета сосуда), который развивается в течение 3-6 месяцев после операции. Таким образом, данные об активности секФЛА2 в крови человека могут дать представления о том, как будут развиваться события после вмешательства кардиохирургов. Так как в настоящее время начинают применять лекарства на основе ингибиторов активности секФЛА2, измерение активности этого фермента в крови важно и для контроля за применением лекарственных препаратов.

Результаты и обсуждение

Флуоресцентные зонды для определения активности секФЛА2 основаны на явлении тушения флуоресценции. Один из жирно-кислотных остатков липида содержит на конце цепи флуорофор, второй — тушитель. При действии фосфолипазы sn-2 ацильная цепь липида отщепляется. Флуорофор и тушитель удаляются друг от друга, что приводит к возрастанию флуоресценции. Важными критериями качества зондов является эффективность тушения флуоресценции и пригодность зонда как субстрата для ФЛА2.

Первые зонды, содержали в качестве тушителя динитрофенильную группу. Механизм тушения при этом был статическим, т.е. Его эффективность зависела от того, как часто сталкиваются флуорофор и тушитель. Большая эффективность тушения флуоресценции соответствовала более коротким цепям липида. С укорачиванием ацильных цепей снижается пригодность флуоресцентного зонда в качестве субстрата для ФЛА2.

Увеличить эффективность тушения удалось используя пары хромофоров, для которых возможен безызлучательный перенос энергии возбуждения флуорофора на тушитель (механизм Фёрстера). Эффективность тушения энергии зависит от расстояния между флуорофором и тушителем и их

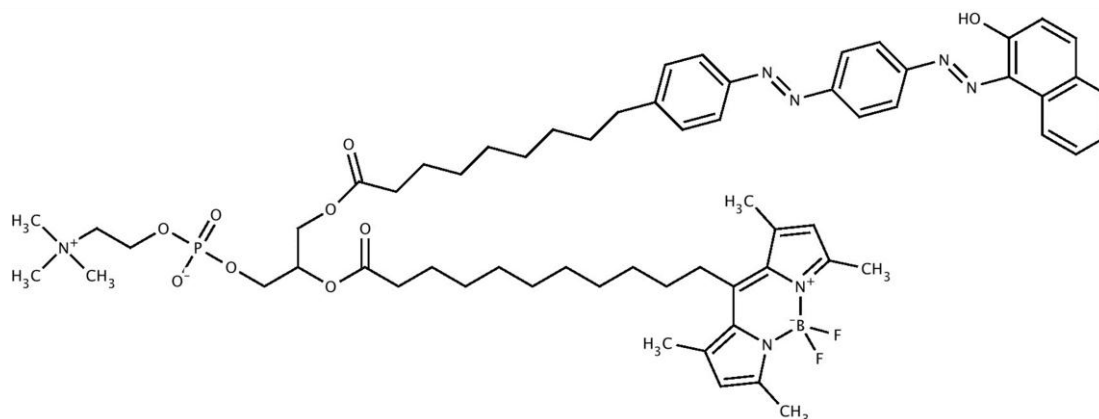


Рис. 1. Структура флуоресцентного субстрата фосфолипазы A2

спектральных характеристик. Расстояние на котором флуоресценция затухает на 50% (радиус Фёрстера) в зависимости от пары флуорофор тушитель составляет 20-50 Å. Это расстояние сопоставимо с длиной ацильных цепей. Таким образом флуоресценция оказывается затухающей не полностью.

Дальнейшее увеличение эффективности тушения флуоресценции стало возможным после того как оказалось, что большинство жестких ароматических молекул в фосфолипидном бислое или в мицелле ПАВ* ориентируются близко к поверхности^{1,2}. Если флуорофор и тушитель при этом вытянутые молекулы, то ориентация в приповерхностном слое означает ориентацию наибольшей оси параллельно поверхности бислоя. При невозможности флуорофора занять такое положение значительно возрастает искажение мембраны зондов, уменьшается стабильность бислоя. В случае BODIPY

* Фосфолипаза А2 гидролизует липиды, находящиеся в мембране клетки. Поэтому в качестве модельных систем для изучения активности ФЛА2 выбираются липосомы или мицеллы.

имеет значение, по какому этому индационный группировки BODIPY присоединен к ацильной цепи. Если по центральному (восьмому) как в зонде на рис. 1 то искажения бислоя не происходит³, если по по третьему (ближайшему к азоту) то искажение бислоя заметно уже при содержании зонда в 1%⁴. При ориентации флуорофора и тушителя вдоль поверхности мембраны их дипольные моменты перехода оказываются параллельными. Это приводит к увеличению вероятности безызлучательного переноса энергии возбуждения и как следствие к увеличению эффективности тушения.

Библиографический список

- 1 Lebedeva N., Ranganathan R., Bales B., // *Journal of physical chemistry B*, **2007**. V. 111. P. 5781.
- 2 Sachl R., Boldyrev I., Johansson L., // *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2010**. V. 12. P. 6027.
- 3 Boldyrev I., Zhai X., Momsen M., Brockman H., Brown R., Molotkovsky J. // *Journal of Lipid Research*, **2007**. V. 48. P. 1518.
- 4 Dahim M., Mizuno N., Li X., Momsen W.E., Momsen M., Brockman H. // *Biophysical Journal*, **2002**, V.83. P. 1511.